

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-179364

(43) 公開日 平成7年(1995)7月18日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/42	J			
9/08	G			
38/23	A B J			
		A 6 1 K 37/ 30	A B J	
			A D D	
		審査請求 未請求 請求項の数 1	O L (全 18 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-326509

(22) 出願日 平成5年(1993)12月24日

(71) 出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72) 発明者 山田 仁

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭
化成工業株式会社内

(72) 発明者 佐藤 弘敏

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭
化成工業株式会社内

(72) 発明者 葛木 茂夫

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭
化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 エルカトニン安定化剤

(57) 【要約】

【構成】 エルカトニンと類似した構造を有する特定のペプチドからなる群よりえられた1種または2種以上を有効成分とするエルカトニン水溶液剤の安定化剤。

【効果】 本発明のペプチドは、極めて少量で注射用水溶液中のエルカトニンの安定性を向上することが可能であり、エルカトニン水溶液剤の安定化剤として有用である。

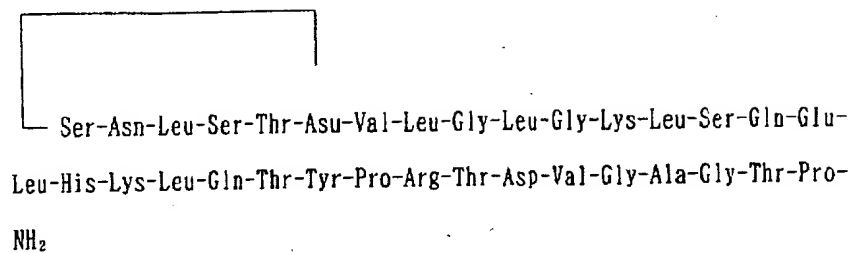
【特許請求の範囲】

* 【化 1】

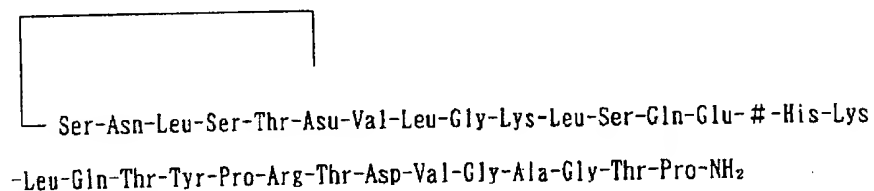
【請求項 1】 下記式 A から H

*

A :

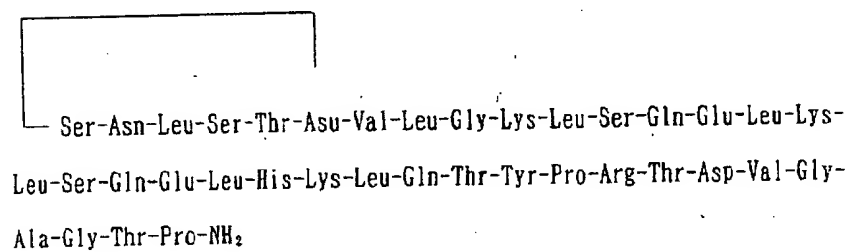


B :



(但し、式中、# は D 体-Leu を示す)

C :



【化 2】

D :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-#
-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

(但し、式中、#はアセチル化Lysを示す)

E :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-
Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

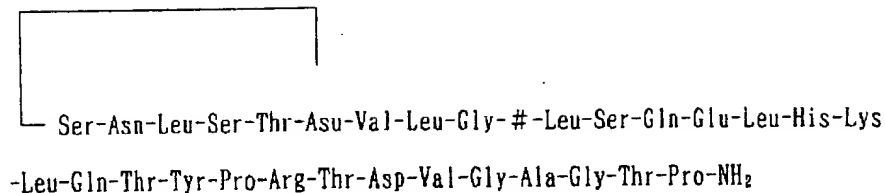
F :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-
Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-
Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

G :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-
Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-
Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

H:



(但し、式中、#はアセチル化Lysを示す)

で表されるペプチドからなる群よりえられた1種または2種以上を有効成分とするエルカトニン水溶液剤の安定化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はエルカトニン水溶液剤の安定化ペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】エルカトニンは化学名1-ブチル-7-(L-2-アミノブチル酸)-26-L-アスパラギン酸-27-L-バリン-29-L-アラニンカルシトニン(サケ)〔1-butyric acid-7-(L-2-aminobutyric acid)-26-L-aspartic acid-27-L-valine-29-L-alaninecalcitonin (salmon)〕で、高カルシウム血症、骨ペーজেット病あるいは骨粗鬆症に用いられるカルシトニン類の一種である。現在エルカトニンは注射用水溶液製剤として使用されているが、他のカルシトニンと同様エルカトニンのようなペプチド性医薬を水溶液製剤とする場合には、熱安定性(長期保存安定性)、光に対する安定性、さらには輸送時等において受ける振とうに対する安定性等に十分配慮した

製剤化が必要である。そこで従来、エルカトニンの水溶液製剤化においては、溶液のpH、使用される緩衝剤の種類、イオン強度について厳密な選択がなされ、さらには使用されるアンプル等のガラス容器の物性についても厳密な選択が必要であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このように、エルカトニンのようなペプチド性医薬の水溶液製剤は極めてデリケートであるため、その有効な安定化剤については長い間求められていた。

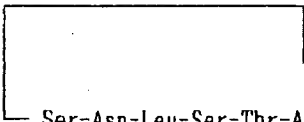
【0004】

【課題を解決するための手段】発明者らは従来より、水溶液とした場合のエルカトニンの安定化剤について、数多くの物質についてスクリーニングを行ってきたが、偶然にもエルカトニンと構造が似ているペプチドのいくつかにおいて、極めて少量でエルカトニンの安定化作用があることを見だし本発明に至った。すなわち本発明は、下記式AからH

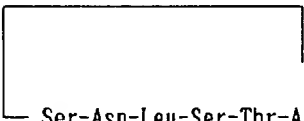
【0005】

【化4】

A :

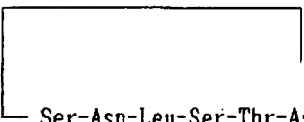

 Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-
 Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-
 NH₂

B :


 Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-#-His-Lys
 -Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

(但し、式中、#はD体-Leuを示す)

C :


 Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Lys-
 Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-
 Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

【0006】

【化5】

D :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-#
-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

(但し、式中、#はアセチル化Lysを示す)

E :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-
Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

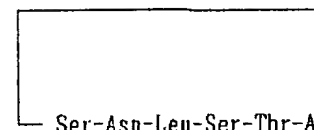
F :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-
Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-
Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

G :

— Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-
Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-
Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

H:



Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-#-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys
 -Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

(但し、式中、#はアセチル化Lysを示す)

【0008】で表されるペプチドからなる群よりえられた1種または2種以上を有効成分とするエルカトニン水溶液剤の安定化剤である。本発明のエルカトニン水溶液注射剤の安定化剤は、公知のペプチド合成の常法手段によって合成できる。

(1) 液相法によって製造する場合

例えば、C末端のプロリン基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式AからHで示されるアミノ酸順序に個々の保護されていないか、又は好ましくは保護されたアミノ酸および(または)低級ペプチドを縮合し、任意の過程で環化反応に付し、縮合反応し、保護基がある場合は、例えば、最終段階で活性基の保護基を酸分解により脱離することにより得られる。

【0009】縮合反応及び環化反応自体はペプチド合成の常法手段に従って、保護基の脱着、縮合反応を繰り返すことにより行なわれる。即ち、本化合物の製造において使用される各種の保護基はペプチド合成において既知なもの、例えば加水分解、酸分解、還元、アミノリシス、ヒドラジノリシスなどのような既知手段によって容易に脱離することができる保護基が用いられる。このような保護基はペプチド合成化学の分野の文献ならびに参考書に記載されている。本発明においては、例えばα-アミノ基の保護にt-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基を用い、側鎖のアミノ基、即ちリジンのε-アミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基、p-クロロベンジルオキシカルボニル基を用い、α-カルボキシル基の保護にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基、即ちのアスパラギン酸またはグルタミン酸の側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基、シクロヘキシルエステル基を用い、α-アミノスベリン酸の側鎖のカルボキシル基の保護にt-ブチルエステル基を用い、セリンおよびスレオニンの水酸基の保護にベンジル基を用い、チロシンの水酸基の保護に2、6-ジクロロベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基の保護にメシチレン-2-スルホン基またはトシル基を用いるのが好ましい。

【0010】本化合物の合成においては個々のアミノ酸および(または)低級ペプチドの縮合は例えば、保護されたα-アミノ基および活性化末端α-カルボキシル基

をもつアミノ酸または低級ペプチドと遊離のαアミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸または低級ペプチドとを反応させるか、あるいは活性化α-アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸または低級ペプチドと遊離の末端カルボキシル基をもつアミノ酸または低級ペプチドとを反応させることにより実施することができる。

【0011】この場合、カルボキシル基は、例えば、酸アジド、酸無水物、酸イミダゾリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、p-ニトロフェニルエステル、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルなどに変換することによって活性化させることができる。また、カルボジイミド、例えばN, N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミド(DCC)、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピル-カルボジイミド、N, N'-カルボニル-ジイミダゾールなどの縮合剤を使用して反応させることによって活性化することができる。

【0012】本発明において好ましい縮合方法及び環化反応は、アジド法、活性エステル法、混合酸無水物法およびカルボジイミド法である。縮合の各段階ではラセミ化が起こらない方法またはラセミ化が最小になる方法を用いるのが望ましく、好ましくはアジド法、活性エステル法、Wunsch法[Z. Naturforsch., 21b, 426 (1966)]またはGeiger法(Chem. Ber., 10., 788 (1970))などが挙げられる。

【0013】なお、環化反応は上述の縮合反応と同じ方法が可能である。縮合順序および環化位置は式で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序如何なる位置でも合成し得るが、C末端側から順次アミノ酸および(または)低級ペプチドを連結させること、およびアミノスベリン酸のωカルボキシル末端と所定のN末端アミノ酸との結合を環化位置とすることが好ましい。

【0014】こうして保護されたε-アミノ基、側鎖カルボキシル基、グアニジノ基および水酸基を有するペプチドが得られる、これらの保護基は好ましくは、酸分解、例えばトリフルオロメタンスルホン酸、無水弗化水素などによる方法によって一段階で脱離され、目的の化合物が得られる。

(2) 固相法によって製造する場合

本発明においては、上記の液相法によるペプチド合成法の他に、固相法によるペプチド合成法を一部または全部利用して本化合物を合成することができる。

【0015】たとえば、C末端ペプチドフラグメントを固相法により合成し、N-末端部の α -アミノスベリン酸を含む環状ペプチドフラグメントを液相法により合成し、引続き上記2つのペプチドフラグメントを固相法により縮合して得られた保護されたペプチド樹脂が得られる。これらの保護基および樹脂は、公知の方法、例えばトリフルオロメタンスルホン酸、無水弗化水素などによる方法によって一段階で脱離され、目的の化合物が得られる。

【0016】上記の固相法で用いられる樹脂としては、固相法で通常用いられる樹脂、例えばベンズヒドリルアミン樹脂、p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂などが挙げられる。この樹脂は、官能基当量や架橋度の違いによって所望の性状を有する樹脂が入手可能であり、市販品を購入することもできる。上記の固相法においては、樹脂に式で示されるアミノ酸順序にC-末端のアミノ酸から順次一つずつ縮合させて行なう。該アミノ酸の官能基は公知の方法により保護基で保護される。上記の保護基の例としては、上記でのべた通りである。

【0017】上記の固相反応に際しては、樹脂を反応器に入れ、ジクロロメタン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、ベンゼン等の樹脂を膨潤させる溶媒を樹脂1gに対し、溶媒2~20mlの割合で添加する。これに、予め別の反応器で樹脂中のアミノ基1当量に対し1~6当量のBoc (t-ブチルオキシカルボニル) アミノ酸とDCCを反応させ、得られた対称無水物を副生したジシクロヘキシル尿素(DCU)より分離して、上記樹脂の入った反応器に加える。縮合剤(DCC)の使用量はBoc-アミノ酸1当量に対し、0.5から3当量を用いる。反応は通常5~60分を行なわれる。

【0018】各工程で得られたBoc-アミノ酸-樹脂またはBoc-ペプチド-樹脂の一部を採取し、常法に従い反応したBoc-アミノ酸量を求めればよい。次に、 α -アミノ基の保護基であるBocをトリフルオロ酢酸のような酸で脱離して、順次縮合反応を遂行すればよい。上記の固相法によるペプチド合成は自動固相合成機を用いるが、手動法で遂行してもよい。これらの操作はすべて窒素ガス気流下で行なうのが望ましい。

【0019】このようにしてペプチドが結合した樹脂が得られる。このようにして得られた保護ペプチド結合樹脂は上記で述べた通り、無水弗化水素などにより、一段階で保護基と樹脂が脱離される。

(3) 分離精製その他

このようにして得られた化合物はペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段によって分離精製することができる。例えば、セファデックスG-25、セファデックスG-50、セファデックスLH-20などのゲル濾過剤

を用いるゲル濾過法、カルボキシメチルセルロース、その他のイオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー、逆相系合成高分子樹脂または化学修飾シリカゲル担体を用いたカラムクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーなどにより行なうことができる。

【0020】本発明の新規化合物はその方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。たとえば、酢酸などの公知の有機酸との塩を形成することができる。尚、本明細書に記載の略記号は次の意味を有する。

- 10 Asu: L- α -アミノスベリン酸
 Asn: L-アスパラギン
 Asp: L-アスパラギン酸
 Ala: L-アラニン
 Thr: L-スレオニン
 Val: L-バリン
 His: L-ヒスチジン
 Arg: L-アルギニン
 Leu: L-ロイシン
 Tyr: L-チロシン
 20 Ser: L-セリン
 Gly: グリシン
 Lys: L-リジン
 Pro: L-プロリン
 Glu: L-グルタミン酸
 Gln: L-グルタミン
 D-Leu: D-ロイシン
 Boc-: t-ブチルオキシカルボニル
 Z-: カルボベンゾキシ
 Fmoc-: フルオレニルメチル
 30 Cl-Z: p-クロロベンジルオキシカルボニル
 Cl₂Bzl: 2,6-ジクロロベンジル
 Ac: アセチル
 Bzl: ベンジル
 OBzl: ベンジルエステル
 OMe: メチルエステル
 Tos: トシル
 TFA: トリフルオロ酢酸
 エーテル: ジエチルエーテル
 DMF: N, N'-ジメチルホルムアミド
 40 MeOH: メタノール
 DCM: ジクロロメタン
 DIEA: ジイソプロピルエチルアミン
 HOBT: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
 MBHA樹脂: p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂
 OSu: N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル
 -OtBu: t-ブチルエステル
 WSCD·HCl: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩
 50 このようにして合成、精製して得られたエルカトニン安定化剤は、その1種または2種以上を、あらかじめエル

カトニン原末に配合して、その後エルカトニン水溶液剤を調製するか、またはエルカトニン水溶液に直接添加溶解して、またはあらかじめ別に溶解しておいたエルカトニン安定化剤の溶液を、エルカトニン水溶液に加えて用いる。その有効量としては、エルカトニンの重量に対して通常、0.5～10重量%、さらに好ましくは1～5重量%である。

【0021】エルカトニン水溶液は、通常に使用されるものであれば特に限定されないが、生理食塩液や各種緩衝液が挙げられ、緩衝液としては特に例えばクエン酸や、酢酸等及びそれら酸の水可溶塩が例示される。それらの濃度は通常、0.05～20mM程度が好ましく、pHは通常5～7が好ましい例として挙げられる。この液に浸透圧調整剤として塩化ナトリウム、塩化カリウム等の非毒性の強電解質無機塩類を添加してもよい。活性成分であるエルカトニンは、適応症や用法等によるが、通常は、容器当たり1～40マイクログラム、濃度とし*

(高速液体クロマトグラフィー条件)

カラム：ODSカラム 内径4mm、長さ150mm

溶出液：グラジエント

A液：0.1%TFA水

B液：アセトニトリル

初期B液濃度15%からB液濃度45%までの直線濃度勾配溶出
(30分間)

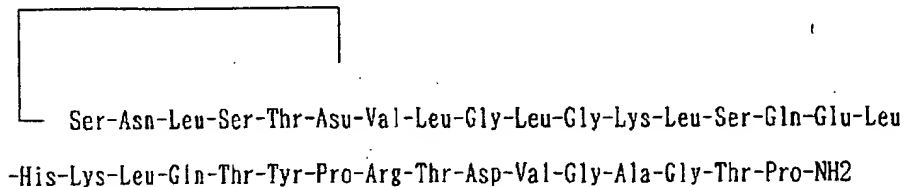
流速 1ml/分

検出波長 225nm

【0024】

【製造例1】

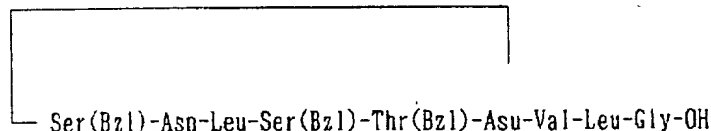
A：



【0026】上記、式Aで表される化合物(F04化合物と略すことがある)の製造

(1)

★



【0028】表記化合物(以下、フラグメント(1)と略すことがある)は、特公昭53-41677公報実施例2(1)～(14)の方法により製造した。

(2)

【0029】

【化9】

*ては通常これらを1ml中に溶解された水溶液が例示される。

【0022】このエルカトニン安定化剤を含んだ注射用エルカトニン水溶液は、例えばアンプル、バイアル等の医薬用ガラス容器またはプラスチック容器に充填して定法により水溶液注射剤とすることができ、活性成分であるエルカトニンの特に振とう安定性に優れた注射剤とすることができる。

【0023】

10 【実施例】以下に製造例、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。なお、各製造例におけるアミノ酸分析は被検体に6N塩酸を加え、110°Cで24時間加水分解させ、これを減圧乾固した後、アミノ酸分析計により分析した。また、物性値で示した高速液体クロマトグラフィーの条件は、以下の通りである。

※【0025】

※【化7】

★【0027】

【化8】

Leu-Gly-Lys(Cl-Z)-Leu-Ser(Bzl)-Gln-Glu(OBzl)-Leu-His-Lys(Cl-Z)-Leu-Gln-Thr(Bzl)-Tyr(Cl2Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂

【0030】の製造

固相合成装置としてApplied BiosystemS社製430-Aペプチドシンセサイザーを用いて固相合成を行った。MBHA樹脂 (Applied Biosystems社製、アミノ基0.61mmol/g) 0.8gをペプチド固相合成用反応容器に入れ、DCM 8ml (4回、各1分)、60% TFA含有DCM溶液 8ml (20分)、DCM 4ml (3回、各15秒)、DIEA 1ml含有DMF溶液 3ml (2回、各1分)、DMF 8ml (6回、各40秒)の順に窒素ガス気流中攪拌下処理し、各々の処理後濾過した。

【0031】一方、Boc-Pro 2mmolをDCM 5mlに溶かし、アミノ酸活性化容器中でDCC (0.5M-DCM溶液) 2mlを加え、5分間反応させた。反応液を濾過して濃縮容器に移し、これにDMF 3mlを加え、窒素ガス気流下DCMを留去した。これにDMF 3mlを加え、前記の反応容器に移して25分反応させた。次いで、DCM 8ml (6回、各20秒)で洗浄、濾過してBoc-Pro-MBHA樹脂を得た。

【0032】次に、前記のBoc-Pro-MBHA樹脂を反応容器中DCM 8ml (4回、各1分で洗浄し、濾過した。これに60% TFA含有DCM溶液 8mlを加え、20分間攪拌し、Bocを脱離した。得られた樹脂をDCM 4ml (3回、各15秒)、DIEA 1ml含有DMF溶液 3ml (2回、各1分)、DMF 8ml (6回、各40秒)で順次洗浄し、濾過した。

【0033】さらに、BocThr(Bzl) 2mmolをDCM 5mlに溶解し、アミノ酸活性化容器中でDCC (0.5

M-DCM溶液) 2mlを加え、5分間反応させた。次いで、Boc-Proの場合と同様に処理し、DMFを加えて窒素ガス気流下で濃縮した後、反応容器に移して20分間反応させた。次いで、DCM 8ml (6回、各20秒)で洗浄、濾過してBoc-Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂を得た。

【0034】以下、C末端からN末端への順で上記目的物の配列に従い、順次対応する保護アミノ酸をカップリングして最後の保護アミノ酸を結合後、N末端Boc基を脱保護するため、TFA処理とその後の洗浄を行い、上記化合物 2.2gを得た。上記固相合成において、Arg, Glnを結合する場合は、2mmolの対応する保護アミノ酸をDMF-DCM (3:1) 混合溶媒 4ml中、DCC溶液 2ml、HOBt溶液 (0.5M-DMF溶液) 2mlを加え、1分間反応させた後、他のアミノ酸同様に処理し、反応容器に移してカップリング反応させ、DCM洗浄、濾過後、もう一度2mmol保護アミノ酸をDMF-DCM (3:1) 混合溶媒 4ml中DCC溶液 2ml、HOBt溶液 (0.5M-DMF) 2mlを加え、25分間反応させたものを反応容器に移してカップリングさせる、いわゆるダブルカップリング法で行なった。

【0035】固相法及び製造例で使用したアミノ酸は次の通りである。

【0036】

【化10】

導入アミノ酸 使用保護アミノ酸 入手方法、メーカー他

(CH₂)₅COOH

Asu	Z-HN-CH-COOCH ₃	特公昭53-41677、実施例2(1)
Asn	Boc-Asn	㈱ペプチド研究所
Asp	Boc-Asp(OBzl)	㈱ペプチド研究所
Ala	Boc-Ala	㈱ペプチド研究所
Thr	Boc-Thr	㈱ペプチド研究所
Val	Boc-Val	㈱ペプチド研究所
His	Boc-His	㈱ペプチド研究所
Arg	Boc-Arg(Tos)	㈱ペプチド研究所
Leu	Boc-Leu · H ₂ O	㈱ペプチド研究所
Tyr	Boc-Tyr(C12Bzl)	㈱ペプチド研究所
Ser	Boc-Ser(Bzl)	㈱ペプチド研究所
Gly	Boc-Gly	㈱ペプチド研究所
Lys	Boc-Lys(C1-Z)	㈱ペプチド研究所
Pro	Boc-Pro	㈱ペプチド研究所
Glu	Boc-Glu(OBzl)	㈱ペプチド研究所
Gln	Boc-Gln	㈱ペプチド研究所

MBHA樹脂: p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂

【0037】(3) 上記(1)で得られた化合物と
(2)で得られた化合物との結合

上記(1)で得られた化合物 700mgをDMF 4mlとN
メチルピロリドン2mlの混合溶媒に溶解し、これに、
上記(2)で得られた化合物 1.6gを加えHOBt 30
0.135gを加え、-15°Cに冷却下、WSCD ·
HCl 0.192gを加え、一晚攪拌した。反応終了
後、吸引濾過し、DMF 5mlとNメチルピロリドン5
mlの混合溶媒10ml、DMF 10ml、DCM 10
mlの順に洗浄し、減圧乾燥して、上記目的物 1.9g
を得た。

(4) F04化合物の製造

上記(3)で得られた化合物 1.0gをHF反応装置
(株)ペプチド研究所製に移し、アニソール2ml
を加え、これに無水フッ化水素20mlを加え、0°C 40
で1時間攪拌した。反応後、無水フッ化水素を減圧下留
去後、残渣をエーテルで洗浄し、これに0.1M酢酸2*

* 0mlを加え、ペプチドを抽出した。抽出液をDowe
x 1X2のカラム(2.6×15cm)に通し、0.
1M酢酸60mlで溶出して凍結乾燥した。これを逆相
系高速液体クロマトグラフィーにより精製し、セファデ
ックスG-25樹脂を使用し0.1M酢酸水でゲル濾過して
4.5mgを得た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 1.97(2), Thr 3.87(4), Ser 2.83(3), Glu 3.13(3), Pr
o 2.20(2), Gly 3.95(4), Ala 1.00(1), Val 1.91(2), Leu
6.32(6), Tyr 0.97(1), Lys 2.18(2), His 1.15(1), Arg
1.12(1), Asu 1.18(1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 25.5分

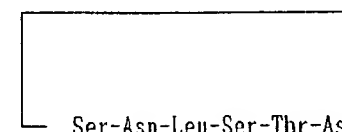
【0038】

【製造例2】

【0039】

【化11】

B:



Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-D-Leu-His
-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

【0040】上記、式Bで表される化合物（以下F05化合物と略すことがある）の製造
 (1) フラグメント (1) の製造
 フラグメント (1) は特公昭53-41677公報実施*

*例2 (1)~(14)の方法により製造した。

(2)

【0041】

【化12】

Lys(Cl-Z)-Leu-Ser(Bzl)-Gln-Glu(OBzl)-D-Leu-His-Lys(Cl-Z)-Leu-Gln-Thr(Bz
 1)-Tyr(Cl2Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-Thr(Bzl)-
 Pro-MBHA樹脂

【0042】の製造

製造例1. (2)と同様に製造例1. (2)で製造した配列と変化している所定のLeuを結合する際、Boc-Leu・H2Oの代りにBoc-D-Leu・H2Oを使用して固相合成して2.1gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた化合物との結合

上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で得られた化合物1.1gを使用して製造例1. (3)と同様に実施して上記目的物1.4gを得た。

(4)F05化合物の製造

上記(3)で得られた化合物1.0gを製造例1.

(4)と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフィーにより精製し、セファデックスG-25樹脂を使用し0.※

※1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物5.6mgを得た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 2.02(2), Thr 3.91(4), Ser 2.85(3), Glu 3.13(3), Pro 2.33(2), Gly 3.09(3), Ala 1.00(1), Val 1.93(2), Leu 5.38(5), Tyr 0.98(1), Lys 2.20(2), His 1.17(1), Arg 1.07(1), Asu 1.20(1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 23.5分

20 【0043】

【製造例3】

【0044】

【化13】

C:

Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Lys-Leu
 -Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly
 -Thr-Pro-NH2

【0045】上記、式Cで表される化合物（以下F08化合物と略すことがある）の製造
 (1) フラグメント (1) の製造
 フラグメント (1) は特公昭53-41677公報実施★

★例2 (1)~(14)の方法により製造した。

(2)

【0046】

【化14】

Lys(Cl-Z)-Leu-Ser(Bzl)-Gln-Glu(OBzl)-Leu-Lys(Cl-Z)-Leu-Ser(Bzl)-
 Gln-Glu(OBzl)-Leu-His-Lys(Cl-Z)-Leu-Gln-Thr(Bzl)-Tyr(Cl2Bzl)-Pro-Arg(Tos
)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂

【0047】の製造

製造例1. (2)と同様にMBHA樹脂にBoc-Proを反応し、結合させ、同様に処理した後、以下、C末端からN末端への順で上記目的物の配列に従い、順次対応する保護アミノ酸をカップリングして最後の保護アミノ酸を

結合後、N末端Boc基を脱保護するため、TFA処理とその後の洗浄を行い、上記化合物2.3gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた化合物との結合

50 上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で

得られた化合物 1. 2 g を使用して製造例 1. (3) と同様に実施して上記目的物 1. 4 g を得た。

(4) F 0 8 化合物の製造

上記 (3) で得られた化合物 1. 0 g を製造例 1.

(4) と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフィーにより精製し、セファデックス G-25 樹脂を使用し 0. 1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物 8. 5 mg を得た。

物性値

アミノ酸分析値

* Asp 1. 93 (2), Thr 3. 88 (4), Ser 3. 61 (4), Glu 5. 00 (5), Pro 2. 02 (2), Gly 3. 02 (3), Ala 1. 00 (1), Val 1. 93 (2), Leu 6. 74 (7), Tyr 1. 01 (1), Lys 3. 33 (3), His 1. 03 (1), Arg 1. 14 (1), Asu 1. 07 (1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 23. 3分

【0048】

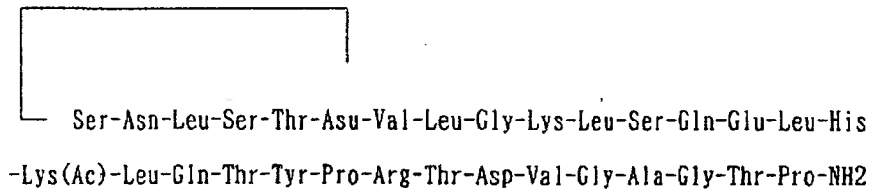
【製造例 4】

【0049】

【化 15】

*10

D :



【0050】上記、式Dで表される化合物 (以下F 17 20※例 2 (1)~(14)の方法により製造した。

化合物と略すことがある)の製造

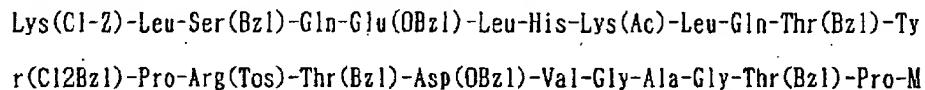
(2)

(1) フラグメント (1) の製造

【0051】

フラグメント (1) は特公昭 53-41677 公報実施※

【化 16】



BHA樹脂

【0052】の製造

製造例 1. (2) と同様に製造例 1. (2) で製造した配列と変化している所定の L y s を結合する際、Boc-Lys(Cl-Z)の代りにBoc-Lys(Ac)を使用して固相合成して 2. 1 g を得た。

(3) 上記 (1) で得られた化合物と (2) で得られた化合物との結合

上記 (1) で得られた化合物 500 mg と上記 (2) で得られた化合物 1. 1 g を使用して製造例 1. (3) と同様に実施して上記目的物 1. 4 g を得た。

(4) F 1 7 化合物の製造

上記 (3) で得られた化合物 1. 0 g を製造例 1.

★1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物 4. 9 mg を得た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 1. 94 (2), Thr 3. 65 (4), Ser 2. 56 (3), Glu 3. 06 (3), Pro 1. 96 (2), Gly 2. 91 (3), Ala 1. 00 (1), Val 1. 96 (2), Leu 4. 76 (5), Tyr 0. 96 (1), Lys 1. 95 (2), His 0. 97 (1), Arg 0. 98 (1), Asu 0. 90 (1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 28. 5分

【0053】

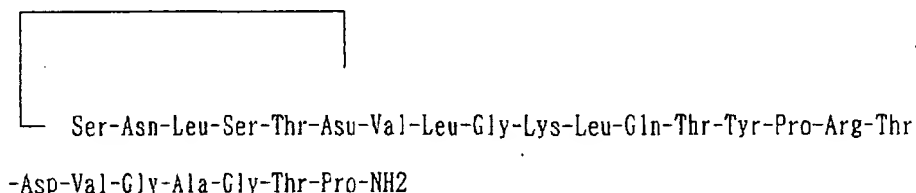
【製造例 5】

【0054】

【化 17】

(4) と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフィーにより精製し、セファデックス G-25 樹脂を使用し 0. ★

E :



【0055】上記、式Eで表される化合物（以下F23化合物と略すことがある）の製造
 (1) フラグメント (1) の製造
 フラグメント (1) は特公昭53-41677公報実施*

*例2 (1)~(14)の方法により製造した。

(2)

【0056】

【化18】

Lys(C1-Z)-Leu-Gln-Thr(Bzl)-Tyr(C12Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂

【0057】の製造

製造例1. (2)と同様にMBHA樹脂にBoc-Proを反応し、結合させ、同様に処理した後、以下、C末端からN末端への順で上記目的物の配列に従い、順次対応する保護アミノ酸をカップリングして最後の保護アミノ酸を結合後、N末端Boc基を脱保護するため、TFA処理とその後の洗浄を行い、上記化合物1.6gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた化合物との結合

上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で得られた化合物1.0gを使用して製造例1.(3)と同様に実施して上記目的物1.3gを得た。

(4)F23化合物の製造

上記(3)で得られた化合物0.9gを製造例1.

(4)と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフ※

F:

Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys
 -Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala
 -Gly-Thr-Pro-NH2

【0060】上記、式Fで表される化合物（以下F26化合物と略すことがある）の製造

(1) フラグメント (1) の製造

フラグメント (1) は特公昭53-41677公報実施★

★例2 (1)~(14)の方法により製造した。

(2)

【0061】

【化20】

Lys(C1-Z)-Leu-Ser(Bzl)-Gln-Glu(OBzl)-Leu-His-Lys(C1-Z)-Leu-Gln-Thr(Bzl)-
 Tyr(C12Bzl)-Pro-His-Lys(C1-Z)-Leu-Gln-Thr(Bzl)-Tyr(C12Bzl)-Pro-Arg(Tos)-
 Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂

【0062】の製造

製造例1. (2)と同様にMBHA樹脂にBoc-Proを反応し、結合させ、同様に処理した後、以下、C末端からN末端への順で上記目的物の配列に従い、順次対応する保護アミノ酸をカップリングして最後の保護アミノ酸を結合後、N末端Boc基を脱保護するため、TFA処理とその後の洗浄を行い、上記化合物2.4gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた

化合物との結合

上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で得られた化合物1.3gを使用して製造例1.(3)と同様に実施して上記目的物1.6gを得た。

(4)F26化合物の製造

上記(3)で得られた化合物1.0gを製造例1.

(4)と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフ

イーにより精製し、セファデックスG-25樹脂を使用し0.

1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物9. 1mgを得た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 2.20(2), Thr 4.94(5), Ser 2.93(3), Glu 4.41(4), Pro 2.42(2), Gly 3.05(3), Ala 1.00(1), Val 2.06(2), Leu 6.19(6), Tyr 1.66(2), Lys 3.20(3), His 2.05(2), Arg *

*0.98(1), Asu 1.15(1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 24.5分

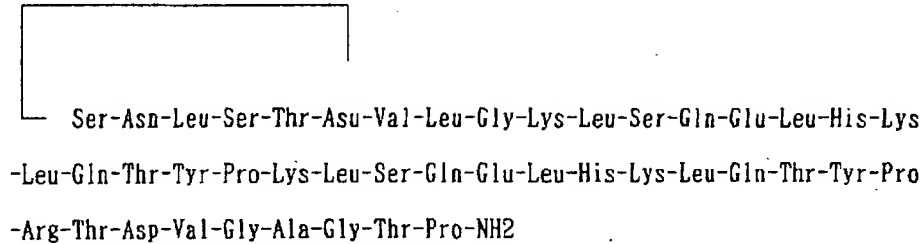
【0063】

【製造例7】

【0064】

【化21】

G:



【0065】上記、式Gで表される化合物（以下F32 ※例2(1)~(14)の方法により製造した。

化合物と略すことある）の製造

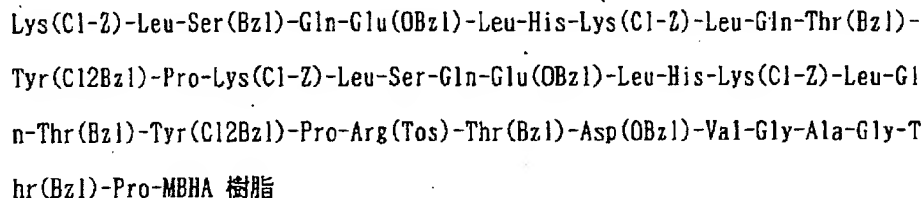
20 (2)

(1) フラグメント (1) の製造

【0066】

フラグメント (1) は特公昭53-41677公報実施※

【化22】



【0067】の製造

製造例1. (2)と同様にMBHA樹脂にBoc-Proを反応し、結合させ、同様に処理した後、以下、C末端からN末端への順で上記目的物の配列に従い、順次対応する保護アミノ酸をカップリングして最後の保護アミノ酸を結合後、N末端Boc基を脱保護するため、TFA処理とその後の洗浄を行い、上記化合物2.5gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた化合物との結合

上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で得られた化合物1.1gを使用して製造例1.(3)と同様に実施して上記目的物1.4gを得た。

(4)F32化合物の製造

上記(3)で得られた化合物1.0gを製造例1.

(4)と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラフ

イーにより精製し、セファデックスG-25樹脂を使用し0.

30 1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物11.7mgを得た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 2.04(2), Thr 4.62(5), Ser 3.42(4), Glu 6.03(6), Pro 3.05(3), Gly 2.99(3), Ala 1.00(1), Val 2.14(2), Leu 7.71(8), Tyr 1.61(2), Lys 3.82(4), His 1.87(2), Arg 1.16(1), Asu 0.97(1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 25.5分

【0068】

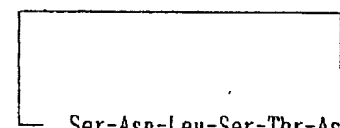
【製造例8】

【0069】

【化23】

40

H:



Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu-Val-Leu-Gly-Lys(Ac)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His
-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂

【0070】上記、式Hで表される化合物（以下F48 10*例2(1)~(14)の方法により製造した。

化合物と略すことがある）の製造

(2)

(1) フラグメント(1)の製造

【0071】

フラグメント(1)は特公昭53-41677公報実施*

【化24】

Lys(Ac)-Leu-Ser(Bzl)-Gln-Glu(OBzl)-Leu-His-Lys(Cl-Z)-Leu-Gln-

Thr(Bzl)-Tyr(Cl2Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Asp(OBzl)-Val-Gly-Ala-Gly-

Thr(Bzl)-Pro-MBHA樹脂

【0072】の製造

製造例1. (2)と同様に製造例1. (2)で製造した 20
配列と変化している所定のLysを結合する際、Boc-Lys
s(Cl-Z)の代りにBoc-Lys(Ac)を使用して固相合成して
2.0gを得た。

(3)上記(1)で得られた化合物と(2)で得られた
化合物との結合

上記(1)で得られた化合物500mgと上記(2)で
得られた化合物1.1gを使用して製造例1. (3)と
同様に実施して上記目的物1.4gを得た。

(4)F48化合物の製造

上記(3)で得られた化合物1.0gを製造例1. 30

(4)と同様に処理して逆相系高速液体クロマトグラ
フィーにより精製し、セファデックスG-25樹脂を使用し0.
1M-酢酸水でゲル濾過して上記目的物7.8mgを得
た。

物性値

アミノ酸分析値

Asp 1.98(2), Thr 3.63(4), Ser 2.55(3), Glu 3.09(3), Pr
o 1.96(2), Gly 2.89(3), Ala 1.00(1), Val 1.94(2), Leu
4.71(5), Tyr 0.80(1), Lys 1.93(2), His 0.96(1), Arg
1.00(1), Asu 0.88(1)

高速液体クロマトグラフィー 保持時間 27.7分

【0073】

【実施例1】製造例1~8で合成、精製して得た8種の
エルカトニン安定化剤について、その安定化効果を調べ
るため、それぞれエルカトニン注射用水溶液に添加し、
エルカトニンの振とう安定性を試験した。

(1)エルカトニン注射用水溶液の調製：蒸留水100
0ml当たりクエン酸ナトリウム・3H₂Oを4.63
g、無水クエン酸を0.37g、さらに塩化ナトリウム
を7.0g加えて溶解し、pH6.0の水溶液を調製し 50

た。この水溶液にエルカトニンを約10μg/ml濃度
となるように溶解し、エルカトニン注射用水溶液を調製
した。

(2)注射剤の調製：蒸留水1000ml当たりクエン
酸ナトリウム・3H₂Oを4.63g、無水クエン酸を
0.37g、さらに塩化ナトリウムを7.0g加えて溶
解し、pH6.0の水溶液を調製した。この水溶液に製
造例1~8で製造した8種のエルカトニン安定化剤を各
々約10μg/ml濃度、または約1.0μg/ml濃
度となるように溶解し、エルカトニン安定化剤の水溶液
を調製した。このエルカトニン安定化剤の水溶液とエル
カトニン注射用水溶液を混合し、安定化剤1種以上の総
量がエルカトニンの量に対して5%、または0.5%含
まれたエルカトニン注射用水溶液の試験液を調製した。
つぎに各々の試験液を1mlずつ通常のガラスアンプル
に充填し、各々約50本のアンプル剤とした。

【0074】また、対照として本発明の安定化剤を含
まない注射用エルカトニン水溶液のアンプル剤を同様に調
製した。

(3)安定性試験：上記の試験液のアンプル剤を恒温振
とう機に入れ、経時的にエルカトニンの含量を液体クロ
マトグラフィーにて測定し、その振とう安定性を調べ
た。

・振とう条件〔振幅：10cm、振とう速度：180回
/分、温度：25℃〕

・液体クロマトグラフィー測定条件〔カラム：ODSカ
ラム(4.6×150mm)、移動相：CH₃CN-
0.1%TFA(1:2)、流速：1ml/min、検
出：UV220nm〕

各注射剤の振とう4週間の残存率を表1に示した。

【0075】

【表1】

エルカトニン水溶液注射剤の振とう安定性

注射剤 NO.	添加した化合物名とその添加量 (化合物名/添加量*)	残存率 (%)	
		2週間後	4週間後
1	F04/5%	70	66
2	F05/5%	90	74
3	F08/5%	92	61
4	F17/5%	83	69
5	F23/5%	86	81
6	F26/5%	75	70
7	F32/5%	73	62
8	F48/5%	90	71
9	F04/2.5%+F48/2.5%	97	86
10	F05/2.5%+F17/2.5%	98	92
11	F08/0.5%	61	47
12	F23/0.5%	58	50
13	F48/0.5%	55	43
対照	-	54	40

* : 添加量はエルカトニンに対する割合

【0076】表1から明らかなように、本発明のエルカトニン安定化剤を含んだ注射用エルカトニン水溶液のアンプル剤は、安定化剤を含まない対照例のアンプル剤より振とう安定性が向上していた。

【0077】

【実施例2】

1) 注射剤の調製：蒸留水1000ml当たりクエン酸 30
ナトリウム・3H₂Oを4.63g、無水クエン酸を
0.37g、さらに塩化ナトリウムを7.0g加えて溶
解し、pH6.0の水溶液を調製した。この水溶液に製
造例3で製造したF08を約10μg/ml濃度となる
ように溶解した。このF08の水溶液と実施例1で調製
したエルカトニン注射用水溶液を混合し、F08がエル
カトニンの量に対して0%、1%、5%、及び10%含
まれたエルカトニン注射用水溶液の試験液を調製した。
つぎに各々の試験液を1mlずつ通常のガラスアンプル
に充填し、各々約100本のアンプル剤とした。

40

2) 安定性試験：上記の試験液のアンプル剤を実施例1
と同様に恒温振とう機に入れ、経時的にエルカトニンの
含量を液体クロマトグラフィーにて測定し、その振とう
安定性を調べた。また、別に上記の試験液のアンプル剤
を40°Cの恒温器に入れ、経時的にエルカトニンの含
量を液体クロマトグラフィーにて測定し、その保存安定
性を調べた。なお、振とう条件及び液体クロマトグラフ
ィー測定条件は実施例1と同条件で行った。

【0078】各注射剤の振とう4週間の残存率を表2
に、40°C、6カ月の保存安定性を表3に示した。

50

【0079】

【表2】

エルカトニン水溶液注射剤の振とう安定性

注射剤 NO.	エルカトニン安定化剤 F08の添加量*	残存率 (%)	
		2週間後	4週間後
1	10%	96	83
2	5%	84	70
3	1%	59	52
4	0%	50	44

* : 添加量はエルカトニンに対する割合

【0080】

【表3】

エルカトニン水溶液注射剤の40°C保存安定性

注射剤 NO.	エルカトニン安定化剤 F08の添加量*	残存率(%)	
		3カ月後	6カ月後
1	10%	95	86
2	5%	95	83
3	1%	91	72
4	0%	90	62

* : 添加量はエルカトニンに対する割合

*【0081】表2及び表3の結果から、本発明のエルカトニン安定化剤であるF08を含んだエルカトニン注射剤は、振とう安定性及び40°Cの保存安定性に優れていた。

【0082】

【発明の効果】本発明のペプチドは、極めて少量で注射用水溶液中のエルカトニンの安定性を向上することが可能であり、エルカトニン水溶液製剤の安定化剤として有用である。

10

*

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

A61K 38/23

// C07K 14/585

識別記号

ADD

庁内整理番号

8318-4H

FI

技術表示箇所